

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0902443-3 A2**

(22) Data de Depósito: 13/07/2009
(43) Data da Publicação: 15/03/2011
(RPI 2097)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 39/008
A61K 31/00
A61P 33/02

(54) Título: **PROCESSO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA IMUNOQUIMIOTERÁPICA PARA TRATAMENTO DE LEISHMANÍASE CANINA E HUMANA**

(73) Titular(es): Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

(72) Inventor(es): Clarisa B. Palatnik de Sousa

(57) Resumo: PROCESSO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA IMUNOQUIMIOTERÁPICA PARA TRATAMENTO DE LEISHMANÍASE CANINA E HUMANA compreendendo uma vacina contendo o antígeno FML (Fucose Mannose-ligand ou Ligante de Fucose e Manose) e o adjuvante saponina, usada em combinação com quimioterápicos, mostrando propriedade curativa, deixando os cães previamente infectados, na condição de cura estéril da leishmaniose visceral e tegumentar, caracterizada por ausência de parasitas e pela ausência total de DNA de Leishmania, visando impedir a transmissão do parasita causador da Leishmaniose canina visceral do cão para o inseto transmissor e desta forma, para outros cães e humanos. A invenção compreende, também, o uso da citada composição para produzir formulações destinadas a tratar a leishmaniose visceral canina e as leishmanioses viscerais e tegumentares murinas, humanas e caninas, bem como kit compreendendo imunoquimioterápicos para tratar as mesmas patologias.



“PROCESSO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA
IMUNOQUIMIOTERÁPICA PARA TRATAMENTO DE LEISHMANÍASE
CANINA E HUMANA”

5 **Campo da Invenção**

A presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica para tratamento de leishmaníase canina visceral compreendendo Imunoquimioterápicos. Tais Imunoquimioterápicos contemplam frações de promastigotas ou amastigotas de *Leishmania* denominadas “Fucose Mannose Ligand” (FML) e adjuvante saponina, em combinação com quimioterápicos. Os quimioterápicos comportam antibióticos antibacterianos, antiparasitários e/ou antifúngicos e/ou antivirais e/ou análogos de nucleotídeos ou nucleosídeos.

Tais composições podem ser empregadas na preparação de formulações usadas no tratamento da citada leishmaniose.

15

Contexto da Invenção

A Leishmaniose visceral humana ou calazar é nas Américas e Mediterrâneo uma conhecida zoonose canina. Insetos flebotomíneos adquirem o agente etiológico alimentando-se em canídeos silvestres transmitindo-o, posteriormente, aos cães. A subsequente transmissão aos humanos pelos flebótomos causa Leishmaniose humana visceral, uma doença grave que pode ser fatal se não tratada adequadamente.

Aproximadamente 500.000 de novos casos humanos de calazar são registrados anualmente no mundo. Uma vacina profilática protetora contra doença humana não está ainda disponível. O melhor desempenho foi logrado com uma vacina experimental de primeira geração que induziu 12% de proteção, apenas entre as pessoas que converteram para positivo no teste intradérmico para o lisado de *Leishmania* (IDR) após a vacinação completa. Até o momento a quimioterapia contra calazar tem se revelado altamente tóxica e nem sempre efetiva.

As Leishmania (L.) chagasi e Leishmania (L.) infantum

são os agentes etiológicos da Leishmaniose visceral humana (LV) em America, no Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia. Trata-se de uma doença severa e freqüentemente letal se não tratada logo após o aparecimento de sintomas.

5 Nesta regiões a doença é uma zoonose de canídeos. Os parasitas estão expostos na pele de cães e raposas, cães selvagens, e são transmitidos aos humanos através da picada e ciclo desenvolvidos nos insetos flebotomíneos.

A leishmaniose visceral zoonótica (LVZ) é uma zoonose de canídeos re-emergente. cujo controle epidemiológico envolve: a eliminação
10 de cães infectados soropositivos, o tratamento dos ambientes domésticos e peri-domésticos com inseticida e o tratamento sistemático dos casos humanos. Brasil é um dos 4 países que concentram 90% dos casos humanos totais (500.000 no Mundo todo). Como ferramenta de controle, o sacrifício dos cães soropositivos é realizado amplamente em Brasil e China, porém não é aceito
15 na Europa. Os programas de controle canino são muito trabalhosos, caros e requerem vigilância permanente e métodos de diagnóstico sorológico mais sensíveis para aumentar a sua eficácia. Além disso, como muitos cães soropositivos são assintomáticos, a adesão da população à campanha é complicada, apesar de que a infecciosidade dos cães assintomáticos para os
20 insetos vetores já foi demonstrada.

O tratamento das residências com inseticidas e a vacinação preventiva de humanos e cães contra a leishmaniose visceral foram consideradas as melhores ferramentas previstas para controle e erradicação da doença, diminuindo ambos, os casos humanos e caninos. Apesar de que várias
25 vacinas foram testadas em experimentos em canil, somente algumas

mostraram eficácia em testes de campo, contra o desafio da infecção natural e somente a vacina Leishmune® esta atualmente licenciada no Brasil, sendo a primeira no Mundo para profilaxia contra a leishmaniose visceral canina.

A vacina Leishmune ® é composta pelo antígeno FML (Ligante de Fucose Manose) de *Leishmania donovani* formulado em 0,5mg de saponina. A formulação contendo o antígeno FML e saponina protegeu 92-95% dos cães gerando de 76-80% de eficácia vacinal em experimentos realizados no Rio Grande do Norte. A Leishmune® já demonstrou proteger 99% dos cães vacinados em São Paulo e Minas Gerais, enquanto que 15,6% dos controles não tratados estavam soropositivos. Ao longo dos dois anos um máximo de 1,2%, dos cães exibiu sintomas no grupo vacinado enquanto que 20,6% dos cães expostos controles eram sintomáticos. Finalmente, enquanto que apenas 1% de óbitos confirmados por calazar foram detectados entre os vacinados até o final do segundo ano, um total de 39% dos animais controles morreram de LVC durante o ensaio. Todas as diferenças entre vacinados e controles foram significantes. Os resultados indicaram a obtenção de 99% de proteção nos animais vacinados, dois anos antes, com Leishmune®. Este valor obtido após o uso da formula industrial Leishmune® se correlaciona com o previamente obtido com a preparação da vacina FML elaborada no nosso laboratório da UFRJ.

Os cães vacinados não expõem parasitas na pele, conforme demonstrado pela ausência de positividade nos testes de PCR de sangue e linfonodos e imunohistoquímica de pele, portanto a infecção dos insetos vetores fica reduzida. Assim mesmo, os anticorpos gerados nos cães vacinados bloqueiam a transmissão da doença uma vez que impedem aos

parasitas potencialmente presentes no sangue sugado de interagir com a membrana intestinal do inseto, impedindo o desenvolvimento normal do seu ciclo e a futura infecção de novos seres humanos ou cães. Enquanto que insetos alimentados com sangue contendo amastigotas de *Leishmania* e soro de cães pré-ímmunes mostraram alta percentagem de infecção e de razão número de parasitas/inseto, fazendo índices de infecção mais altos, insetos alimentados com soro de cães vacinados com Leishmune® (anticorpos IgG2 anti-FML predominantes) mostraram 74.3% de redução da infecção.

Por outro lado, os flebótomos alimentados com soros de cães infectados (anticorpos anti-FML IgG1 predominantes) mostraram um aumento pronunciado da infecção (230.7%). Estes resultados indicam que a Leishmune® é uma vacina bloqueadora da Transmissão (TBV), e que os anticorpos presente no soro de cães vacinados, mesmo 12 meses após vacinação, auxiliam na interrupção da epidemia.

Apesar de que a cobertura vacinal atual no Brasil ainda é baixa, já se observa nitidamente o declínio do número de casos humanos e caninos nas localidades vacinadas enquanto que um aumento dos mesmos se detecta nas regiões não submetidas à vacinação.

Em efeito, o possível efeito aditivo da vacinação canina com Leishmune®, sobre a remoção de cães, na interrupção da epidemia foi investigado. Em Belo Horizonte (BH), curvas crescentes de incidência canina e humana foram observadas nos distritos de Barreiro, Venda Nova e Noroeste, enquanto que a incidência humana e canina de Centro Sul, Leste, Nordeste, Norte, Pampulha e Oeste, começaram a decrescer ou se mantiveram estáveis após vacinação com Leishmune®. Conforme se observa na Tabela1, entre os

distritos mostrando um declínio na percentagem de incidência humana (-36.5%), Centro Sul e Pampulha mostraram as percentagens maiores de vacinação canina (63.27% e 27.27%, respectivamente) e as menores incidências caninas (-3.36%, 1.89%, respectivamente).

5 Eles foram seguidos por Oeste, que vacinou 25.30% dos animais e experimentou um aumento de apenas 12.86 % da incidência canina e por Leste e Nordeste, com menores proporções de vacinados (11.72 e 10.76%, respectivamente) e provavelmente por isso, incidências caninas levemente maiores (42.77 e 35.73%). A única exceção foi a do distrito Norte
10 onde a redução da incidência humana e canina não foi correlacionada com a vacinação com Leishmune®.

 Proporções muito menores de cães foram vacinados em Venda Nova (4.35%), Noroeste (10.27%) e Barreiro (0.09%) que, de acordo com isso, exibiram incidências caninas muito aumentadas (24.48, 21.85 e
15 328.57%, respectivamente), e pronunciados aumentos de incidência humana (14, 4 e 17%, respectivamente). O declínio da incidência canina e humana estão correlacionados com o aumento do número de cães vacinados, confirmando o efeito aditivo da vacinação com Leishmune® sobre o controle por sacrifício dos cães, reduzindo o reservatório de parasitas, protegendo cães,
20 reduzindo o risco de transmissão da LV para humanos, e desta forma se mostrando como uma nova ferramenta efetiva de controle da LV. Também foi demonstrado que a vacinação com Leishmune® não interfere na campanha de controle sorológico (110.000 cães). Apenas 1,3% de positividade (76 dos 5,860) foi detectada entre os cães vacinados com Leishmune® que se
25 mostraram não infectados em testes parasitológicos.

Distritos	Ano	Total de Casos	Cães Positivos	Incid. Canina (%)	Δ incid. canina	Vacinas acumuladas de Leishmune®	Cães vacinados (%)	Casos humanos	Δ casos humanos (%)
Centro Sul	2004	5190	201	3.87		1900		5	
	2005	10298	274	2.66		3686		6	
	2006	6823	255	3.74	-3.36	4317	63.27	3	-40
Leste	2004	12337	811	6.57		389		16	
	2005	16925	1039	6.14		768		12	
	2006	8103	760	9.38	42.77	950	11.72	6	-63
Nordeste	2004	12151	1044	8.59		374		24	
	2005	18684	1544	8.26		851		14	
	2006	10792	1258	11.66	35.73	1161	10.76	18	-25
Norte	2004	11551	1014	8.78		27		22	
	2005	20817	2295	11.02		46		20	
	2006	12190	1203	9.87	12.41	49	0.40	13	-41
Pampulha	2004	3899	372	9.54		824		6	
	2005	11998	1082	9.02		1741		10	
	2006	7993	777	9.72	1.89	2180	27.27	3	-50
Oeste	2004	6116	456	7.46		652		10	
	2005	11799	850	7.20		1338		11	
	2006	6484	546	8.42	12.86	1641	25.30	10	0
Média anual		11027.89	882.83	7.88	17.05	1271.89	23.12	11.94	-36.5
Barreiro	2004	8783	197	2.24		2		6	
	2005	7609	375	4.93		4		6	
	2006	6434	617	9.6	328.57	6	0.09	7	17
Venda Nova	2004	11434	1177	10.29		134		21	
	2005	19378	2263	11.68		259		14	
	2006	12072	1547	12.81	24.48	525	4.35	24	14
Noroeste	2004	9021	760	8.42		375		24	
	2005	17127	1516	8.85		1000		17	
	2006	11572	1187	10.26	21.85	1188	10.27	25	4
Média anual		11926.33	1113.56	8.94	124.97	388.11	4.90	16	11.67
IC95%		5698.73-18153.93	215.74-2011.37	6.55-11.33	-119.45-369.39	82.35-693.87	-2.18-11.98	4.82-27.18	2.23-21.11

Legenda da Tabela 1: incidência canina (%): percentual de cães soropositivos entre o total de cães analisados; Δ incidência canina: variação do percentual da incidência canina de 2006 com relação à 2004; número acumulado de cães vacinados com Leishmune® = número de cães que receberam 3 doses no primeiro ano e um reforço anual nos anos seguintes de acordo com dados dos números de doses distribuídas aos veterinários; Percentagem acumulada de cães vacinados: variação percentual do número de cães vacinados em 2006 relativo a 2004; Δ casos humanos: variação percentual do número de casos humanos em 2006 com relação à 2004. IC95%= intervalo de confiança 95%.

Um total de 65000 cães sadios foram vacinados no Brasil

até Outubro de 2008.

Considerando que os cães infectados são sacrificados e que a vacina é profilática e redutora da transmissão, surgiu a idéia de que aumentando a concentração do adjuvante saponina, a vacina pudesse se tornar curativa para oferecer uma futura alternativa ao sacrifício dos cães. Foi

observado que a vacina Leishmune® formulada com a concentração dupla de saponina (1mg/dose) tinha efeito terapêutico tanto contra a leishmaniose visceral canina experimental quanto contra a naturalmente adquirida em área endêmica. A imunoterapia com Leishmune® enriquecida de saponina aumentou os níveis de anticorpos IgG2 correlacionados com resposta protetora, os níveis de linfócitos CD8+ produtores de Interferon gama, e gerou de 79 a 95% de respostas IDR positivas resultando na sobrevivência dos cães tratados por até 5 anos (até o presente) que se mostravam assintomáticos e livres de parasitas no mês 22 do experimento. Até a mesma data, 37% (17/46 cães) de óbitos por LVC foram registrados no grupo controle não tratado.

A imunoterapia com Leishmune® pode então representar um benefício no tratamento dos cães enquanto que o tratamento apenas quimioterápico não é recomendado, e é proibido no Brasil, devido a que é feito com as poucas drogas eficazes para tratamento humano podendo agir na seleção de parasitas resistentes, e tendo mostrado resultados de eficácia controversos. Em efeito, apesar de gerar uma remissão temporária dos sintomas, o relapso usualmente acontece semanas ou meses após a finalização do tratamento. A LVC é tratada freqüentemente com antimoniato de Meglumina (Glucantime®), allopurinol, Anfotericin B ou a combinação de Glucantime e alopurinol.

A presente invenção representa uma novidade uma vez que revela que a quimioterapia combinada à Imunoterapia com a vacina Leishmune enriquecida de saponina determina a cura estéril de cães portadores de Leishmaniose canina visceral, não somente pelo seu aumento de sobrevivência se não também pela ausência de parasitas e DNA dos parasitas nos mesmos.

Ilustrativamente, mas não limitadamente, citam-se os seguintes quimioterápicos: análogos da inosina, formicina e análogos de nucleosídeos; antibióticos antibacterianos: aminoglicosídeos, anfenicóis, ansamicinas, beta-lactâmicos como penicilinas e cefalexinas, lincosamídeos, macrolídeos, polipeptídeos, tetraciclina, cicloserinas, mupirocinas, tuberinas, diaminopirimidinas, nitrofuranos, quinolonas, sulfonamidas, sulfonas, enrofloxacin, paromomicina e outros aminoglicosídeos, drogas

antiparasitárias: allopurinol, antimoniais pentavalentes (N-Methyl-meglumina, stibogluconato de Na), Anfotericina B, Anfotericina B lipossomal, aminosidina, pentamidina, alquilfosocolinas, metronidazole, buparvaquone, sitamaquina ou 8 aminoquinolona e temporinas, drogas anti-fúngicas: ketoconazol, fluconazol, itraconazole, terbinafina, e drogas anti-câncer como: a miltefosina e estimaquina entre outras

Na presente invenção, reitera-se, tanto na Composição, quanto na Formulação, Uso ou Kit, a saponina pode, preferencialmente, ser enriquecida. A invenção será melhor compreendida a partir do seguinte ensaio de caráter meramente exemplificativo, não limitativo.

Um total de 104 cães com Leishmaniose canina visceral natural de duas cidades do interior do Estado de São Paulo, Brasil foram observados neste ensaio. Todas estas cidades mostraram episódios recentes de epidêmicos de VL humana e animal. Todos os animais eram soropositivos ao antígeno FML de *Leishmania (L.) donovani* no ensaio FML-ELISA e assintomáticos no início do ensaio. Todos os cães eram acompanhados regularmente por duas Clínicas Veterinárias Especializadas.

Para evitar qualquer interferência no ensaio e sabendo que o incremento em anticorpos séricos anti-FML de cães infectados é correlacionado ao aumento no número de sintomas e com os resultados PCR Leishmania-DNA positivos, a distribuição dos cães no grupo tratado seguiu uma randomização estratificada relatada aos seus valores de absorbância sérica nos ensaios FML-ELISA. Neste experimento os grupos tratados IT e ICT apresentaram composição similar de raças, no tangente à proporção das mesmas relacionadas à suscetibilidade clínica e parasitológica (Tabela 2), não havendo diferenças significativas nas proporções de cães de raças de maior suscetibilidade. Três doses da vacina foram injetadas através da rota subcutânea no dorso dos animais, com 20-30 dias de intervalo.

Tabela 2. Composição de raças após randomização dos grupos IT e ICT.

Imunoterapia	Número de cães	Imunoquimioterapia	Número de cães
Pastor alemão	1	Pastor alemão	1
Doberman	1	Doberman	1
Boxer	4	Boxer	3
Schnauzer	1	Cocker Spaniel	1
Pastor Australiano	2	Rottweiler	4
Pit Bull	2	Poodle	4
Poodle	2	Labrador	2
Labrador	4	Pit Bull	1
Pinscher	1	Pinscher	2
Daschund	1	Fox Paulistinha	3
Lhasa Apso	1	Daschund	4
Bassethound	1	Dogo	1
SRD	10	SRD	8
Total	31		35

As raças marcadas em cinza são as consideradas suscetíveis à LVC por critérios clínicos, parasitológicos ou genéticos.

5

Foram inicialmente comparados cães tratados com a vacina Leishmune® enriquecida de saponina (1mg) com cães tratados com a vacina elaborada no laboratório da UFRJ e demonstrado que não havia diferenças significativas entre ambas no que diz respeito à percentagem de cães sintomáticos, ou com reações de IDR positivas, PCR positivos ou parasitas nos linfonodos e mortes por LVC indicando que a formulação industrial mantém as propriedades imunoterápicas descritas para a formulação laboratorial.

10

Estes resultados demonstram que o processo de industrialização não alterou as propriedades imunogênicas previamente descritas para a vacina feita no laboratório.

15

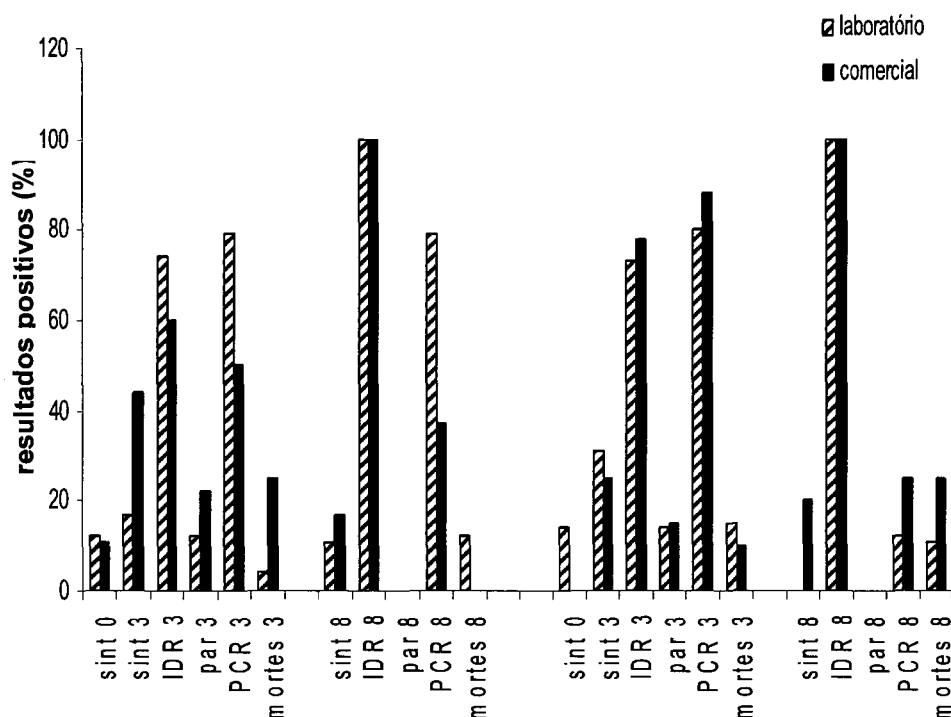
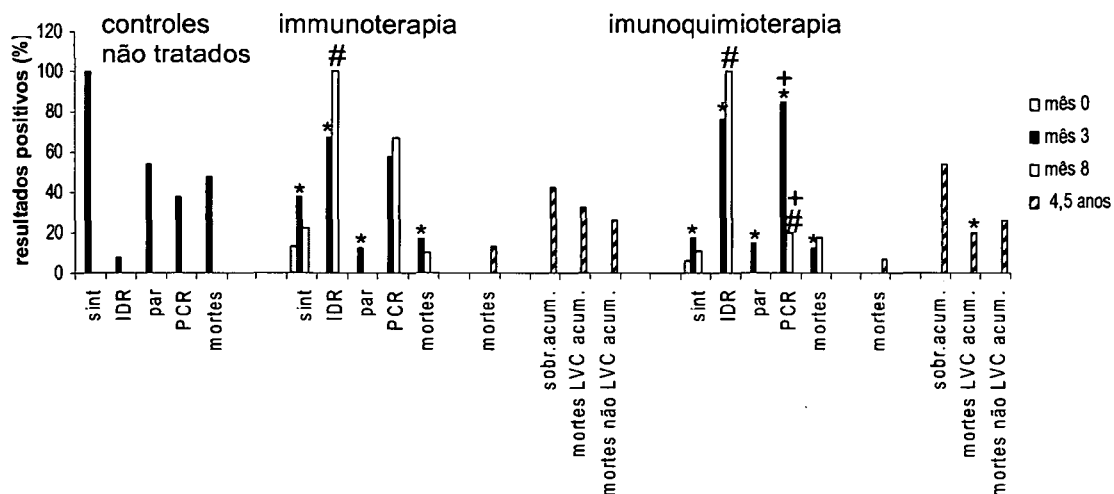


Figura 1: Análise comparativa do impacto da vacina Leishmune® enriquecida com saponina (1,5mg de antígeno FML e 1mg de saponina/dose) e da mesma formulação feita no laboratório, quanto às proporções de casos sintomáticos (sint), óbitos, parasita (par) nos linfonodos, evidências de DNA por PCR em linfonodos e IDR para antígeno de Leishmania, sendo as vacinas utilizadas em imunoterapia ou imunoquimioterapia contra CVL. O grupo de tratamento de imunoterapia foi composto por 15 cães que receberam a vacina comercial e 16 cães que receberam a vacina feita no laboratório, ao passo que o tratamento de imunoquimioterapia foi dado a 21 cães tratados com a vacina comercial e 14 cães tratados com a vacina feita no laboratório com Leishmune® enriquecida. Não houve diferenças significantes entre a formulação feita no laboratório e a comercial quanto à proporção dos resultados positivos de qualquer variável nem no tratamento IT, nem no tratamento ICT. A comparação das proporções foi feita utilizando o Teste Exato de Fisher (Graphpad Software).

A partir destes resultados os cães vacinados com a vacina comercial ou feita no laboratório foram avaliados em conjunto. Posteriormente, o efeito Imunoterápico (IT) da vacina Leishmune (n=31) foi comparado ao efeito Imunoquimioterápico (ICT) (n=35), utilizando a vacina Leishmune® enriquecida de saponina juntamente com alopurinol (10 mg/kg cada 12 horas por 15 meses em 23 cães) ou alopurinol em combinação com anfotericina B, cada três dias, 16 doses em 9 cães) no tratamento contra LVC, e enrofloxacin (5 mg/kg uma vez ao dia durante 10 dias em 1 cão) ou cefalexina (30 mg/kg cada 12 horas por 7 dias em 1 cão) contra infecções secundárias.

Nenhuma diferença significativa na proporção de cães sintomáticos foi encontrada entre controles não-tratados, cães tratados IT ou ICT antes do tratamento (mês 0) (Figura 2) confirmando a homogeneidade dos grupos.



• Significativamente diferente dos controles não tratados

significativamente diferente dos resultados do mês 3 no seu próprio grupo

+ significativamente diferente do tratamento IT

- 5 Legenda da Figura 2: Sinais clínicos, parasitológicos e imunológicos em cães com LVC, após o tratamento com vacina Leishmune® enriquecida com saponina com ou sem quimioterapia adicional. Trinta e um cães com LVC naturalmente adquirida receberam três doses de Leishmune® enriquecida com saponina somente (IT), 35 foram tratados com vacina e quimioterapia adicional (ICT), ao passo que 25 permaneceram como controles não tratados. A
- 10 proporção de óbitos, achados de amastigotas ou DNA de Leishmania por PCR nos linfonodos e a proporção de respostas de IDR positivas para antígeno de Leishmania foram também registrados nos meses 3 e 8. As barras representam a proporção de resultados positivos em cada grupo de tratamentos. AS proporções acumuladas de mortes por LVC, mortes por outras causas e de sobrevivência 4,5 anos após o início do experimento estão também representadas.
- 15 A comparação das proporções foi feita utilizando o Teste Exato de Fisher (Graphpad Software).

No terceiro mês após a vacinação (Figura 2), eficácia similar e diferenças não significativas foram encontradas entre os dois tratamentos na maioria das variáveis. Quando comparados com os controles

20 não tratados, ambos os tratamentos, IT e ICT, aumentaram a proporção de respostas de IDR positivas (de 8 a 67-76%), e reduziram a proporção de casos sintomáticos (de 100 à 33-18%), a proporção de casos com evidência de parasitas (de 54 a 12-15%), e a proporção de mortes devidas ao LVC (de 48 a 19-12%) revelando o controle da doença clínica e parasitológica que tornou

25 assintomáticos a maioria dos cães. Até o mês 3, entretanto, nem o tratamento IT, nem o ICT foram capazes de eliminar a evidência de DNA de Leishmania em linfonodos e até um aumento significativo da mesma sobre a dos controles

(38%, $p=0.0075$) e sobre a do grupo IT (58%, $p=0.0487$) foi visto no grupo ICT (85%) revelando a sua importante condição de infecção latente (Figura 2). O resultado indica que ambos os tratamentos IT e ICT, logo depois da vacinação, aumentaram e sustentaram a importante resposta imune celular protetiva contra infecção Leishmania, impedindo o avanço da doença, reduzindo a proporção de mortes e tornando os cães assintomáticos, mas portadores de uma infecção inaparente por Leishmania, revelada somente pela presença de residual de DNA de Leishmania detectado pelas ferramentas diagnósticas moleculares. A recuperação da resposta imune celular é devida ao tratamento IT com Leishmune uma vez que nenhuma contribuição significativa adicional da quimioterapia se observa para essa variável.

Como o potencial terapêutico da vacina Leishmune enriquecida, através de IT e de ICT já era evidente no mês 3, e a sintomatologia e morte estavam significativamente aumentados nos controles não tratados, por razões éticas, os veterinários neste ensaio decidiram tratar os cães controle com quimioterapia contra CVL e eles foram excluídos do experimento após o mês 3.

A Figura 2 também representa os resultados obtidos no mês 8 após a vacinação completa. Cães do dois grupos IT e ICT exibiram aumentos adicionais nas proporções dos resultados positivos de IDR, presentes em apenas 8% dos controles não tratados no mês 3, e detectados em 100% dos animais no mês 8. Esses resultados representam 33 a 24% de aumento significativo respectivo, sobre os valores registrados no mês 3, expressando que todos os cães infectados recuperaram a respectiva resposta imune celular ativa contra Leishmania depois da vacinação. Nenhuma significativa mudança significativa em casos sintomáticos, mortes ou evidência parasitária foi observada, revelando que os dois tratamentos sustentam a condição assintomática adquirida no mês 3. A única diferença significativa observada entre os dois tratamentos no mês 8 foi uma pronunciada diminuição na proporção de cães apresentando resultados PCR positivos (de 85 a 20%; $p=0.0001$), observado apenas no grupo ICT, enquanto o grupo IT permaneceu inalterado (de 58 a 67%; $p=0.7288$), sugerindo que a o tratamento de quimioterapia adicional à vacinação com Leishmune enriquecida com saponina,

aboliu a condição de infecção latente e curando os cães. A diferença altamente significativa entre as positivities no PCR do grupo ICT (20%) e do grupo IT (67%) no mês 8 ($p=0.0253$) (Figura 2) indicam que 70% do aumento na taxa de cura foi conseguida pelo tratamento ICT.

Informações obtidas 4,5 anos após o início dos ensaios revelaram não haver diferenças significativas na taxa de sobrevivência dos grupos IT ou ICT. Apenas mais 13% dos cães do grupo IT (3/23) e mais 7% do grupo ICT (2/30) morreram de LVC entre o mês 8 e 4.5 anos (Figura 2). A proporção acumulada de mortes por CVL nestes 4.5 anos do experimento foi 32% para o grupo IT (10/31) e 20% do grupo ICT (7/35) ($p=0.2780$). Esta diferença não significativa sugere um poder curativo semelhante dos dois tratamentos. Porém quando comparados com o grupo de controle não tratado no mês 3 (12/25 cães, 48%), uma diminuição na taxa de óbitos por LVC é somente observada após o tratamento por ICT (7/35 cães, 20%; 0.0273), mas não após o tratamento IT (32%, $p=0.278$) (Figura 2). Considerados juntamente com a negatização dos resultados PCR dos linfonodos, os resultados apontam para vantagem do tratamento ICT no controle e cura estéril de LCV.

Para donos de cães e veterinários, o sucesso do tratamento quimioterápico significa a remissão dos sinais clínicos, porém em áreas endêmicas isto é inaceitável porque os vetores estão presentes e a possibilidade de que estes cães ainda sejam infecciosos e de que a doença seja transmitida para humanos, não pode ser excluída. Para parasitologistas, a cura significa a eliminação dos parasitas, enquanto que para os órgãos de saúde pública, epidemiologistas e entomologistas, a ausência de infectividade para insetos flebótomos e o bloqueio da transmissão de cepas resistentes, é suficiente. Recentemente, a cura clínica e parasitológica é, portanto considerada insuficiente e se procura a cura estéril, sem evidências de parasitas ou de DNA de *Leishmania*, para considerar o cão curado e não transmissor.

Neste trabalho demonstramos que o tratamento dos cães infectados com Leishmune® enriquecida é capaz de aumentar a resposta imune celular, reduzir os casos sintomáticos, a presença de parasitas nos linfonodos e as mortes. Ou seja, o tratamento de IT com Leishmune®

enriquecida é capaz de controlar a doença, induzir remissão e promover a cura clínica e parasitológica dos animais rapidamente. Estes resultados já tinham sido demonstrados em trabalhos anteriores. No tratamento por ICT, o uso adicional de quimioterápicos permite atingir, 8 meses após o início da vacinação, a cura estéril dos animais, eliminando a presença de DNA de *Leishmania* dos linfonodos, conforme revelado por métodos de diagnóstico molecular de grande sensibilidade, deixando os cães não infecciosos. Em efeito, estes animais não apresentam risco de transmissão da doença para humanos nas áreas endêmicas. O achado de um índice cumulativo de óbitos menor no grupo tratado por ICT, 4,5 anos após o início do experimento, confirma a superioridade deste tratamento.

Os resultados desta invenção investigada em grupos de 31 a 35 cães ganham importância se comparados com o resto da literatura que utiliza de 5 a 17 cães apenas.

A cura clínica e parasitológica após tratamento com Leishmune® enriquecida já tinha sido mostrada anteriormente, e foi também sugerida após a utilização simultânea de duas doses de Leishmune® profilática (0.5mg de saponina). Diferente de nossos resultados, apenas o controle clínico e parasitológico parcial foi atingido após o uso de tratamento com a vacina Leish110f-MPL (monofosforil-lipídio A)-SE (esqualeno) em combinação com Glucantime® ou com Glucantime®, indicando a menor eficácia desta vacina e adjuvantes, fato que já tinha sido apontado pelo fracasso prévio desta vacina em testes de campo.

Por outro lado o tratamento exclusivamente quimioterápico com antimônio pentavalente, alopurinol, anfotericina B, anfotericina B lipossomalizada, aminosidina, pentamidina e várias drogas antimicrobianas e antifúngicas tais como metronidazol, cetoconazol e fluconazol induzem algum tipo de melhora clínica, mas a cura parasitológica é difícil de ocorrer e evidências de DNA usualmente persistem.

Em efeito, após terapia com antimoníato parasitas foram recuperados parasitas a partir de 79% dos 15 cães tratados e 5/6 cães eram PCR positivos. Assim mesmo 9/10 cães tratados com alopurinol mostravam recuperação clínica mais 8 deles eram positivos na cultura de parasitas ou

PCR de aspirados de linfonodo. Também 5 de 6 cães tratados com meglumina e alopurinol permaneceram parasitologicamente positivos e 2 deles foram infecciosos para flebótomos. Treze cães tratados com anfotericinaB lipossomal mostraram uma rápida melhora clínica, mas se mantiveram parasitologicamente positivos, tendo sido detectada recidiva em 12 dos mesmos. Onze de 12 cães tratados com aminosidina melhoraram clinicamente mais 4/4 mostraram parasitas em cultura de amostras de linfonodos. Com doses maiores de aminosidina 3/12 cães mostraram ausência de sintomas e de parasitas por 4 anos com recidiva acontecendo nos 9 restantes. Cães tratados com pentamidina também melhoram clinicamente, mas recidivam.

Na nossa investigação observamos que a imunoterapia com Leishmune® enriquecida de saponina obteve melhores resultados do que os previamente reportados para o tratamento quimioterápico apenas, e que a imunoquimioterapia com Leishmune® foi melhor que o tratamento com imunoterapia exclusiva.

A imunoquimioterapia com Leishmune® enriquecida é melhor que a quimioterapia usual com alopurinol, uma vez que reduz o seu tempo de uso e a toxicidade intrínseca. Enquanto cães tratados com alopurinol apenas se recuperam em 2 a 6 meses, sem cura parasitológica ou negativação de PCR mesmo com 20 meses de tratamento e recidiva em $\frac{3}{4}$ cães, o tratamento por ICT com Leishmune® e 15 meses de alopurinol revelou 89% de cura clínica, 100% de cura parasitológica e de recuperação da resposta imune celular e 76% de negativação do PCR, já no mês 8.

O efeito de ICT foi estudado para uma vacina de lisado de *Leishmania (L.) infantum* e Glucantime® em 5 cães acompanhados apenas por 6 meses. Os animais tratados apresentaram melhor clínica, porém com recidiva em 3/5 e aspirados de linfonodo positivos. Portanto, a imunoterapia com Leishmune® enriquecida foi superior a imunoquimioterapia com a vacina de *L. (L.) infantum*.

Recentemente foi observado que a imunoterapia com Leishmune®, usando duas doses simultâneas da vacina profilática licenciada, que contém 0.5mg de saponina, em lugar de uma dose da vacina enriquecida,

que contém 1mg de saponina, deixou cães infectados assintomáticos e negativos na imunohistoquímica por 2 anos.

Considerando as deficiências da quimioterapia na CVL e seu impacto negativo no controle epidemiológico da doença, o possível uso de uma vacina protetora na imunoterapia dos cães já infectados é altamente encorajadora e teria mais ampla aceitação na comunidade, do que o controle baseado no sacrifício dos cães infectados. A expressiva proteção e decréscimo da incidência humana e caninas lograda previamente pela vacina FML no ensaio de campo e recentemente pela vacina Leishmune®, elevaram a perspectiva do seu uso nas tentativas em imunoterapêutica canina. Esta invenção demonstrou o valor terapêutico da vacina Leishmune® saponina em combinação com quimioterápicos, quando utilizada no tratamento Imunoquimioterápico da Leishmaniose visceral canina, revelando seu extraordinário e surpreendente potencial como inédita ferramenta para controle da doença em áreas endêmicas.

O efeito benéfico da terapia ou imunoquimioterapia com a vacina FML-saponina ou Leishmune®, demonstrado na prevenção e tratamento da leishmaniose visceral canina, se mostra pela diminuição conseqüente da leishmaniose visceral humana, causada no Brasil por *Leishmania chagasi*, podendo se estender à prevenção, tratamento e cura das leishmanioses viscerais causadas na Europa e África (Mediterrâneo) por *Leishmania infantum*, uma vez que o antígeno FML é reconhecido pelos soros humanos e de cães infectados com *L.(L.) infantum* na Espanha, e das leishmanioses viscerais da Ásia e África, uma vez que o antígeno FML é obtido a partir de células de *Leishmania (L.) donovani* (Sudan), que é o agente causal da doença humana na Índia e em algumas regiões da África.

Considerando que no mundo, grande parte das áreas de incidência de leishmaniose visceral se superpõe às de leishmaniose tegumentar, doença mais freqüente e menos letal, porém mutilante, a vacina FML-saponina ou Leishmune® pode ser usada como ferramenta bivalente na prevenção, controle, imunoterapia ou imunoquimioterapia de ambas as leishmanioses: viscerais e tegumentares. De cada 2.000.000 de novos casos anuais de leishmaniose no Mundo, 1.500.000 correspondem à leishmaniose

tegumentar, que se apresenta sob a forma de 3 síndromes clínicas de expressão variável, conhecidas como: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose difusa (LD). As espécies de parasitas do gênero *Leishmania* estão separadas em dois subgêneros: *Leishmania* (L.) e *Viannia* (V.), existindo aproximadamente 30 espécies que causam morbidade e mortalidade em áreas endêmicas. Enquanto que as leishmanias do complexo donovani (*L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum*-*L. (L.) chagasi*) são agentes causais do calazar ou leishmaniose visceral, as leishmanias do complexo mexicana (*L. (L.) mexicana*, *L. (L.) pifanoi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. enrietti*, *L. (L.) venezuelensis*) e do complexo braziliensis (*L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naiffi*) causam as leishmanioses cutânea, mucocutânea e difusa no Novo Mundo enquanto que as *L. (L.) tropica*, *L. (L.) major*, *L. (L.) aethiopica* são agentes de leishmaniose tegumentar no Velho Mundo.

Mais de 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Afeganistão, Irã, Arábia Saudita, Síria, Brasil e Peru. Estima-se que 350.000.000 de seres humanos estão sob risco de contraírem algum tipo de leishmaniose. No Brasil, aproximadamente 90% dos casos humanos de leishmaniose visceral se concentravam no Nordeste até 1993. Em 2002, 64,02% dos casos correspondem ao Nordeste sendo que a epidemia se estendeu pelo Norte (14,12%), Centro-Oeste 8,22% e Sudeste (13,63%) do país. Um importante surto da doença se registra atualmente em São Paulo e Mato-Grosso do Sul. A leishmaniose tegumentar por outro lado, apresentou 28569 casos no ano de 2004, sendo estes distribuídos por todo o país com maior concentração nos estados do Norte, Nordeste e Centro Oeste.

No intuito de iniciar uma possível vacina bivalente, contra as leishmanioses visceral e cutânea, demonstramos anteriormente que a vacina FML-saponina induziu 65% de proteção, em animais desafiados com *L. (L.) mexicana*. Assim mesmo, demonstramos que camundongos Balb/c vacinados com 3 doses de FML combinadas com IL-12, saponina Quil-A, Riedel de Haën ou QS-21 induziram respostas significativamente aumentadas de anticorpos e de IDR contra lisado de *L. (L.) amazonensis*. As respostas

foram até maiores que as geradas em animais vacinados com a fração análoga ao FML isolada de *L.(L.) amazonensis* confirmando o potencial imunoprolático do FML de *L.(L.) donovani* contra ambas as leishmanioses. O FML contém como maior fração antigénica a glicoproteína GP36, identificada após clonagem como a enzima Nucleosídeo Hidrolase (NH36). Esta enzima é vital para o parasita, pois cliva nucleosídeos importados liberando bases para a confecção do DNA do parasita. A vacina de DNA contendo o gene da NH36, a VR1012NH36 foi imunoprolática e imunoterapêutica contra a leishmaniose visceral murina por *L. chagasi* e cutânea murina por *L. mexicana*, sugerindo que este antígeno principal do FML induz protecção cruzada contra leishmaniose tegumentar. Recentemente, identificamos por clonagem a Nucleosídeo hidrolase de *L.(L.) amazonensis* com altíssima homologia com a identificada em *L.(L.) donovani* o que explica a possível base molecular da protecção cruzada. Foi também analisada a resposta imune e protecção induzida em camundongos Balb/c, pela vacinação com 3 doses subcutâneas de FML (150µg) + saponin (100µg) contra a infecção por 106 promastigotas de *L. amazonensis* obtidos de amastigotas de hamsters.

Na semana 26, após a infecção, diferenças significativas foram encontradas entre os grupos, no aumento de tamanho das patas ($p=0.004$). A vacina FML+ saponina induziu 49% de redução na evolução dos tamanhos das lesões (Figura 1). Em efeito, o aumento no tamanho das patas foi detectado em 5 de 7 animais tratados com salina e apenas 1 tratado com FML-saponina (Figura 1). A análise da carga parasitária por diluição limitante do tecido das lesões dos sobreviventes indicou que houve uma protecção significativa nos animais vacinados com FML+ saponina (Figura 2). Em efeito, foram detectados 81,8% de redução nos títulos de parasitas e 77,8% de redução nas contagens de parasitas dos animais vacinados com FML-saponina.

Os nossos resultados sugerem que a vacina FML-saponina induz protecção significativa cruzada contra leishmaniose tegumentar por *L. (L.) amazonensis* e por *L. (L.) mexicana* confirmando o potencial desta vacina como ferramenta de controle de ambas as leishmanioses: visceral e tegumentar. A detecção prévia de efeito prolático e imunoterápico da vacina

de DNA, contendo o antígeno NH36 do FML contra as leishmanioses viscerais e tegumentares murinas e a leishmaniose visceral canina, confirma a relevância do complexo FML na proteção contra ambas as doenças e sugere o seu potencial efeito curativo na imunoquimioterapia das leishmanioses viscerais e tegumentares humanas.

5

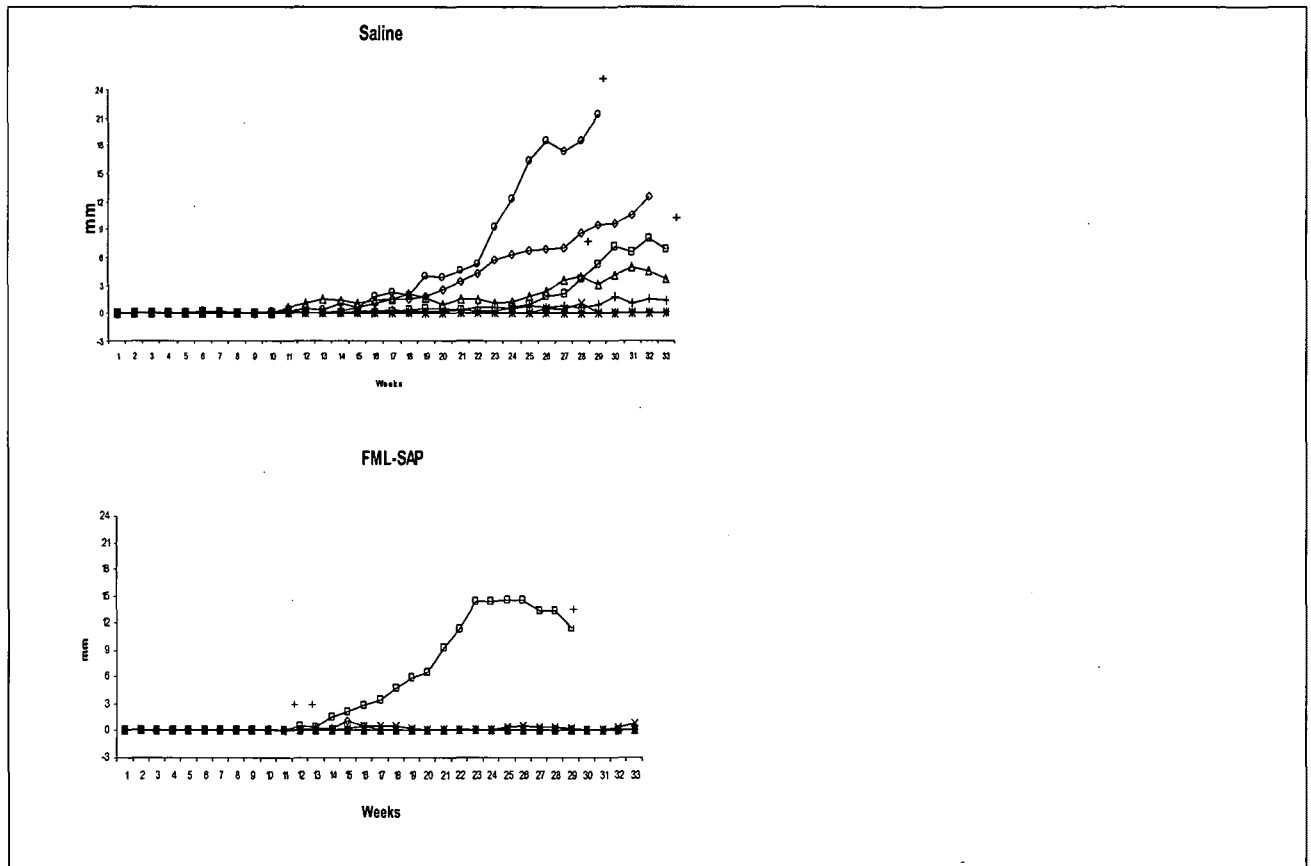


Figura 3 Evolução do tamanho das patas infectadas de camundongos Balb/c (n=7/ grupo) tratados com salina ou vacina FML-saponina e desafiados com promastigotas infectivos de *Leishmania (L.) amazonensis*.

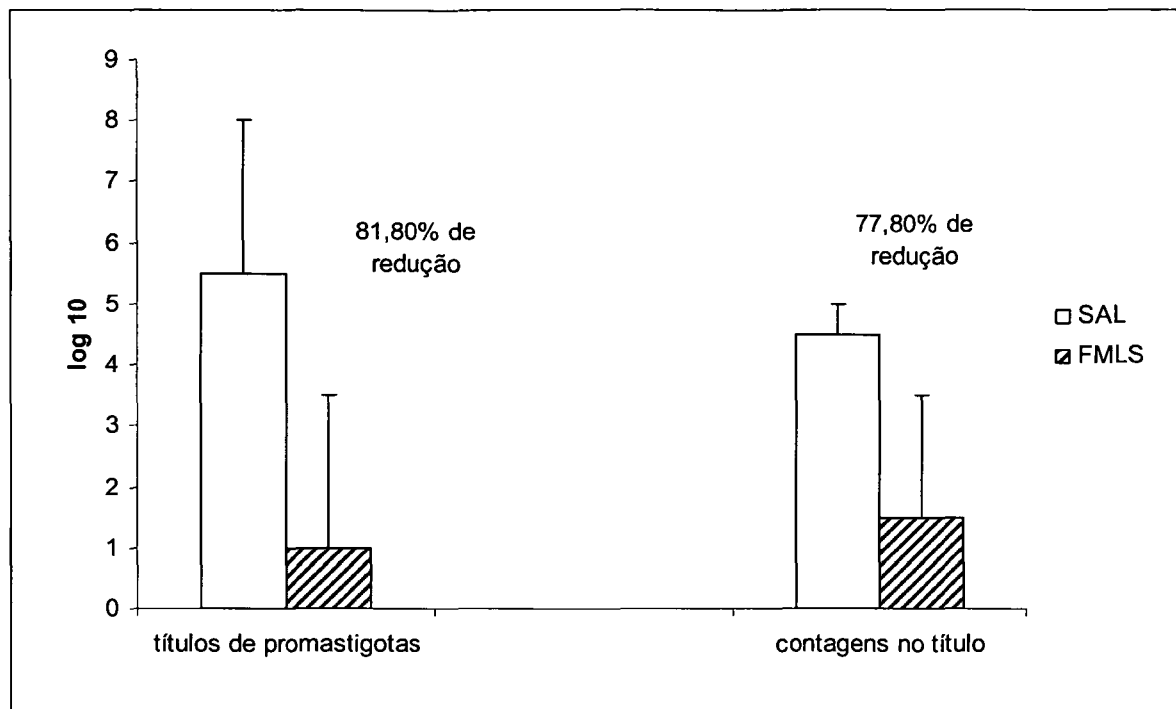


Figura 4. Quantificação da carga parasitária nas patas de camundongos vacinados com FML-saponina; à esquerda, \log_{10} da diluição máxima na qual são observados parasitas (título), à direita, \log_{10} do número de promastigotas na diluição equivalente ao título.

REIVINDICAÇÕES

1.- "PROCESSO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA IMUNOQUIMIOTERÁPICA PARA TRATAMENTO DE LEISHMANÍASE CANINA E HUMANA", caracterizado pelo fato de compreender uma vacina contendo o antígeno FML ("Fucose Mannose–ligand ou Ligante de Fucose e Manose) e o adjuvante saponina, usada em combinação com quimioterápicos, para o tratamento das Leishmanioses humanas e animais, em especial das leishmanioses viscerais caninas.

2.- "PROCESSO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA IMUNOQUIMIOTERÁPICA PARA TRATAMENTO DE LEISHMANÍASE CANINA E HUMANA", caracterizado pelo fato de compreender uma vacina contendo entre 0,5 e 1000 mg/ml do antígeno FML ("Fucose Mannose –ligand ou Ligante de Fucose e Manose) e de 0,5 a 1000 mg/ml do adjuvante saponina, utilizados em combinação com quimioterápicos para tratamento das Leishmanioses humanas e animais, em especial das leishmanioses viscerais caninas.

3.- "PROCESSO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA IMUNOQUIMIOTERÁPICA PARA TRATAMENTO DE LEISHMANÍASE CANINA E HUMANA", de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por incluir na vacina, frações de promastigotas ou amastigotas de Leishmania, denominadas FML ("Fucose Mannose –ligand ou Ligante de Fucose e Manose) e a sua subfração nucleosídeo-hidrolase (NH36), e saponina, em combinação com quimioterápicos.

4.- "PROCESSO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA IMUNOQUIMIOTERÁPICA PARA TRATAMENTO DE LEISHMANÍASE CANINA E HUMANA", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato que os quimioterápicos contemplam antibióticos, drogas anti-câncer e/ou antifúngicos e/ou antivirais.

5.- "PROCESSO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA IMUNOQUIMIOTERÁPICA PARA TRATAMENTO DE LEISHMANÍASE CANINA E HUMANA", de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que os quimioterápicos contemplam: análogos da inosina, formicina e análogos de nucleosídios; antibióticos antibacterianos: aminoglicosídeos,

anfenicóis, ansamicinas, beta-lactâmicos como penicilinas e cefalexinas, lincosamídeos, macrolídeos, polipeptídeos, tetraciclina, cicloserinas, mupirocinas, tuberinas, diaminopirimidinas, nitrofuranos, quinolonas, sulfonamidas, sulfonas, enrofloxacina, paromomicina e outros aminoglicosídeos, drogas antiparasitárias: alopurinol, antimoniais pentavalentes (N-Methyl-meglumina, stibogluconato de Na), Anfotericina B, Anfotericina B lipossomal, aminosidina, pentamidina, alquilfosocolinas, metronidazol, buparvaquone, sitamaquina ou 8 aminoquinolona e temporinas, drogas antifúngicas: ketoconazol, fluconazol, itraconazol, terbinafina e drogas anticâncer tais como a miltefosina, estimaquina, entre outras.

6.- "PROCESSO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA IMUNOQUIMIOTERÁPICA PARA TRATAMENTO DE LEISHMANÍASE CANINA E HUMANA", de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de utilizar a vacina com saponina e qualquer dosagem de quimioterápicos, administrados por via mucosa (oral, nasal, retal e vaginal), ocular, intradérmica, intraperitoneal, subcutânea e/ou intramuscular.

7.- "PROCESSO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA IMUNOQUIMIOTERÁPICA PARA TRATAMENTO DE LEISHMANÍASE CANINA E HUMANA", caracterizado pelo incluir um KIT para tratamento de Leishmaniose visceral canina.

8.- "PROCESSO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA IMUNOQUIMIOTERÁPICA PARA TRATAMENTO DE LEISHMANÍASE CANINA E HUMANA", de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de o referido kit compreender a vacina Leishmune[®] de formulação profilática contendo 0.5 mg de saponina e a vacina Leishmune[®] de formulação imunotérapica (contendo de 1-100 mg/ml de saponina) e quimioterápicos, para o tratamento da leishmaniose visceral canina, administrados por qualquer via.

9.- "PROCESSO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA IMUNOQUIMIOTERÁPICA PARA TRATAMENTO DE LEISHMANÍASE CANINA E HUMANA", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a referida vacina ser aplicada em cães, reduzindo a presença dos parasitas expostos nos cães, reduzindo assim o número de parasitas nos insetos

flebotomíneos que se alimentam nos cães e, finalmente, reduzindo a infecção de outros cães e humanos por estes insetos.

10. "PROCESSO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA IMUNOQUIMIOTERÁPICA PARA TRATAMENTO DE LEISHMANÍASE CANINA E HUMANA", de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato da imunoquimioterapia com a referida vacina apresentar propriedade curativa, deixando cães previamente infectados na condição de cura estéril da leishmaniose visceral e tegumentar, caracterizada por ausência de parasitas e pela ausência total de DNA de *Leishmania*.

11. "PROCESSO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA IMUNOQUIMIOTERÁPICA PARA TRATAMENTO DE LEISHMANÍASE CANINA E HUMANA", de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato do tratamento com a referida vacina ser de uso potencial na imunoterapia e imunoquimioterapia animal e humana contra a leishmaniose visceral e tegumentar.

RESUMO

"PROCESSO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA IMUNOQUIMIOTERÁPICA PARA TRATAMENTO DE LEISHMANÍASE CANINA E HUMANA" compreendendo uma vacina contendo o antígeno FML

5 ("Fucose Mannose—ligand ou Ligante de Fucose e Manose) e o adjuvante saponina, usada em combinação com quimioterápicos, mostrando propriedade curativa, deixando os cães previamente infectados, na condição de cura estéril da leishmaniose visceral e tegumentar, caracterizada por ausência de parasitas e pela ausência total de DNA de *Leishmania*, visando impedir a transmissão do
10 parasita causador da Leishmaniose canina visceral do cão para o inseto transmissor e desta forma, para outros cães e humanos.

A invenção compreende, também, o uso da citada composição para produzir formulações destinadas a tratar a leishmaniose visceral canina e as leishmanioses viscerais e tegumentares murinas, humanas
15 e caninas, bem como kit compreendendo imunoquimioterápicos para tratar as mesmas patologias.